

ALT正常HCVキャリアの治療適応を考える

Indication of antiviral therapy in hepatitis C virus carriers with normal alanine aminotransferase



熊田 卓(写真) 豊田秀徳

Takashi KUMADA and Hidenori TOYODA

大垣市民病院消化器科

◎ALT(alanine aminotransferase)正常(基準値内)のC型肝炎ウイルス(HCV)キャリアの自然経過、治療適応、治療成績について述べる。ALTは肝細胞障害時に血中に遊出してくる逸脱酵素のため、ワンポイントのみの判断は危険で、経過を考慮して判断する必要がある。著者らの提唱する“積分平均値”で評価すると、肝発癌と密接な関係があり、ALTが基準値内(40 IU/l以下)であっても、ALTが20 IU/lを超えかつ血小板が15万/m³未満の症例は他の群に比べて有意に肝発癌が高率であり、条件を整えば抗ウイルス療法の適応と考えられた。一方、現在の標準的治療であるペグインターフェロン(PEG-IFN)＋リビリン療法は、ALTが正常であっても異常であっても著効率に変わりはなかった。一方、治療によって“寝た子を起こす”状態になることも少なかった。日本ではC型肝炎患者の高齢化が進んでおり、異常値を示すまで待つて治療機会を逸しないよう注意して、治療開始時期を判断する必要がある。



正常ALT、C型肝炎ウイルス(HCV)、積分平均値、肝発癌、著効

ALT(alanine aminotransferase)は、L-アラニンと2-オキソグルタル酸をピルビン酸とL-グルタミン酸に変換するアミノ酸転移反応を触媒する酵素である。ALTはAST(aspartate aminotransferase)とは異なり臓器特異性が高く、肝と腎に多量に含まれており、肝疾患の活動性の指標としてきわめて有用とされる。このことがいままで、わずかな変化で医師をも含めて患者とともに「喜ぶ憂する“GPT(ALT)神話”を生み出し、医療現場に少なからざる影響を及ぼしてきた。ALTはあくまで逸脱酵素であり、細胞膜の透過性亢進あるいは細胞破壊によって血中に遊出してくる。しかし、肝細胞は約2,500億個あるとされており、血清ALT値はワンポイントで評価することは危険で、経過から判断する姿勢を忘れてはならない。C型肝炎の活動性を示す指標のひとつとして血清ALT値はもちろん重要ではあるが¹⁾、他の肝機能検査も考慮する必要がある。

最近、C型肝炎に対する知識が広まりHCV抗体検査が一般に行われるようになり、ALT正常

(基準値内)の患者が多く医療機関を訪れるようになった。これらの患者をどのように検査し、治療していくかについては現場で少なからぬ混乱がみられている。本稿ではALT正常C型肝炎の自然経過、治療適応および治療成績について、著者らの施設のデータを中心として述べる。

ALT正常(基準値内)症例の自然経過

血清ALTの基準値の上限は各施設で異なっている。最近、イタリアで献血集団を対象とした健康人3,925例のデータから基準値上限が報告され²⁾、各国で作成されたガイドラインにも取り入れられている。性差を設け、男性の基準値上限は30 IU/l、女性の基準値上限は19 IU/lという厳しいものであった。しかし、わが国では実際には性差を設けず、基準値上限を40 IU/l前後に設定している施設が多いようである。また、ALT持続正常(per-sistently normal ALT: PNALT)例の定義についても議論がある。通常、6カ月間に3回ALTを測定し、3回とも基準値範囲内にある症例とする報告

	3	5	10 (年)
..... : ALT 20 IU/l以下 (n=180)	22.9	33.2	48.1%
— : ALT 21~30 IU/l (n=165)	37.6	50.4	70.3%
— : ALT 31~35 IU/l (n=53)	69.8	73.6	82.9%

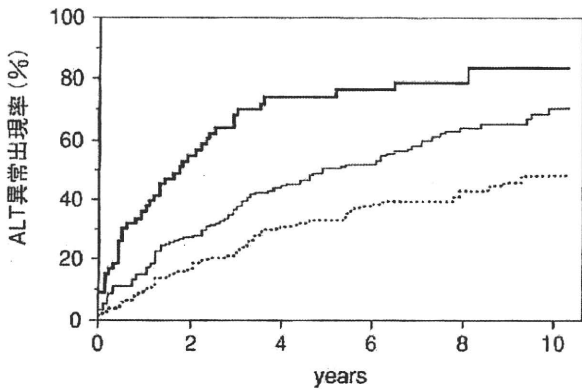


図1 ALT基準値内症例での異常出現率 (n=398)
ALT 20 IU/l 以下の症例, ALT 21~30 IU/l の症例,
ALT 31~35 IU/l の症例の間には有意差を認めた ($p < 0.0001$).

が多い^{3,4)}.

PNALT 患者が経過観察中に ALT 基準値上限を超える比率を検討した。対象とした患者の基準値上限は 35 IU/l (当院での基準範囲) で、経過観察開始から 6 カ月間血清 ALT 値が基準値内で経過した 398 例の無治療例である⁵⁾。経過観察開始後 10

年の時点での異常発現率は、ALT 20 IU/l 以下の群、ALT 21~30 IU/l 群および ALT 31~35 IU/l 群ではそれぞれ、48.1%、70.3% および 82.9% と後 2 群で有意に高率であった (図 1)。さらに、性別でみると女性では ALT 20 IU/l を境として、男性では ALT 30 IU/l を境として、異常発現率が異なった (図 2)。これらは前述した Prati らの報告している女性と男性の基準値上限とよく一致している²⁾。また、Okanoue らは ALT 30 IU/l 以下の 69 例の HCV キャリアを 5 年以上観察し、30 IU/l 以下を持続したのは 10 例 14.5% のみで、39 例 56.5% は一過性上昇を、20 例 29.0% は持続的上昇を示すようになったと報告している⁶⁾。著者らのデータときわめてよく一致している。さらに、Puoti らは再活性化した症例を検討しているが、21.5% としており、持続的に異常を示すようになる症例の比率はそれほど高くはないようである⁷⁾。

一方、経過観察中の肝細胞癌の発生は生命予後に直接関係してくるため重要な問題である。ALT の評価はワンポイントではなくて経過を考慮する必要があることは前述した。評価方法として、①測定した ALT 値をすべて積算して測定回数で割る“単純算術平均値”、②測定した ALT 値と時間軸

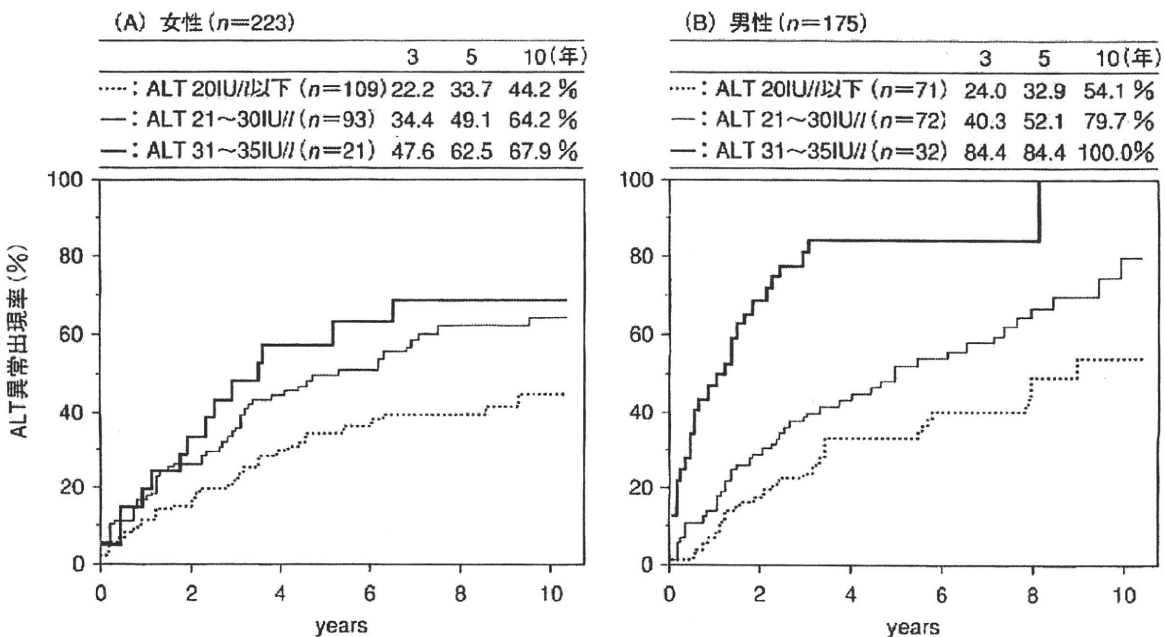


図2 性別にみたALT基準値内症例での異常出現率

女性では、ALT 20 IU/l 以下の症例と ALT 21~30 IU/l および ALT 31~35 IU/l の症例の間には有意差を認めた ($p < 0.0001$)。一方、男性では、ALT 20 IU/l 以下および ALT 21~30 IU/l の症例と ALT 31~35 IU/l の症例の間には有意差を認めた ($p < 0.0001$)。

表 1 ALT 40 IU/l以下の症例での発癌に関する因子 (n=519)

		Hazard ratio (95%CI)	p
年齢(歳)	≤65	1	0.028
	>65	2.006(1.078~3.733)	
ALT (IU/l)	≤20	1	0.012
	>20	6.242(1.499~25.987)	
血小板 (×10 ⁴ /m ³)	≥15.0	1	0.003
	<15.0	2.675(1.407~5.085)	
総ビリルビン (mg/dl)	≤1.2	1	0.012
	>1.2	2.798(1.257~6.228)	
ALP (IU/l)	≤338	1	0.004
	>338	2.486(1.327~4.657)	
アルブミン (g/dl)	≥3.5	1	0.019
	<3.5	2.707(1.177~6.223)	

ALT : alanine aminotransferase, ALP : alkaline phosphatase.

	Hazard ratio (95%CI)	p
— : 血小板15万/m ³ 以上, ALT 20IU/l以下 (n=82)	1	
— : 血小板15万/m ³ 以上, ALT 20IU/lを超える (n=258)	4.359 (0.576-33.008)	0.154
..... : 血小板15万/m ³ 未満, ALT 20IU/l以下 (n=35)	2.549 (0.159-40.763)	0.508
— : 血小板15万/m ³ 未満, ALT 20IU/lを超える (n=144)	18.503 (2.525-135.576)	0.004

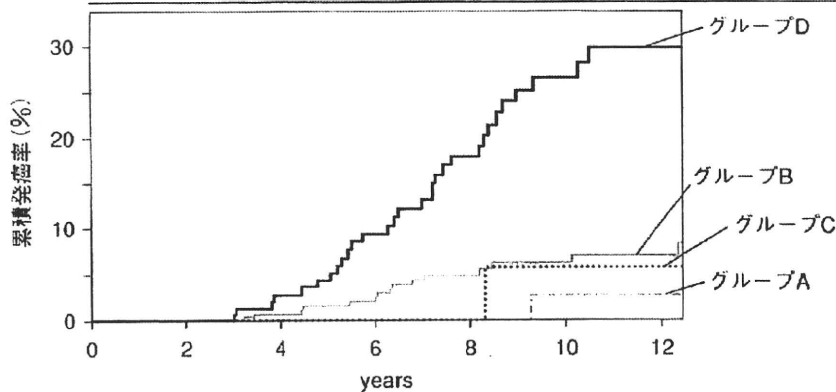


図 3 血清ALT値と血小板からみた発癌率

ALT と血小板の値から、①血小板 15 万/m³以上, ALT 20 IU/l 以下(グループ A, n=82), ②血小板 15 万/m³以上, ALT 20 IU/l を超える(グループ B, n=258), ③血小板 15 万/m³未満, ALT 20 IU/l 以下(グループ C, n=35), および④血小板 15 万/m³未満, ALT 20 IU/l を超える(グループ D, n=144), の 4 つのグループに分類した。グループ D は他の 3 群に比べて肝発癌率は有意に高値であった。グループ A, B, C の間には差を認めなかった。

を合わせた曲線下面積を求め、経過観察期間で割る“積分平均値”, ③ALT の測定回数中, 基準値を超える回数から分類する“パターン分析”などが考えられる。

著者らは以前から ALT 値の評価方法として、発癌の観点からみると積分平均値が有用であることを報告してきた。ALT の積分平均値が高くなるにつれて、発癌率は明らかに増加した⁸⁾。これを、ALT の積分平均値が 40 IU/l 以下で治療介入のな

されていない 519 症例に絞って検討した⁹⁾。年齢, 性, BMI (body mass index), ウイルス量, 遺伝子型, 血小板, プロトロンビン時間, ALT の積分平均値, ALT が持続正常かどうか, AST 値の積分平均値, γ -GTP (gamma glutamyl transpeptidase) の積分平均値, 総ビリルビン, ALP (alkaline phosphatase) の積分平均値, コリンエステラーゼ, 総蛋白, アルブミン, 総コレステロールの 17 因子を投入して, Cox の比例ハザードモデル(変数増加

表 2 ALT 40 IU/l以下症例のALT値と血小板からみた背景因子

	グループ A ≤20 IU/l ≥15×10 ³ /m ³ (n=82)	グループ B >20 IU/l ≥15×10 ³ /m ³ (n=258)	グループ C ≤20 IU/l <15×10 ³ /m ³ (n=35)	グループ D >20 IU/l <15×10 ³ /m ³ (n=144)
年齢(歳)*	62(21~87)	65(18~87)	69(48~88)	67(41~87)
性(女性/男性)**	58/24	138/120	18/17	76/68
BMI(kg/m ²)	20.8(15.8~26.8)	22.0(14.1~34.6)	21.4(17.9~33.3)	20.5(14.3~31.1)
遺伝子型(1/2)	28/25	140/67	6/7	65/30
PNALT(あり/なし)*	56/26	52/206	20/15	20/124
ウイルス量(KIU/ml)	82.5(0.51~4,900)	360(0.54~30,000)	290(1.6~1,000)	270(0.55~5,000)
総ビリルビン(mg/dl)*	0.4(0.4~4.4)	0.5(0.2~3.7)	0.6(0.2~4.6)	0.7(0.2~4.7)
ALP(IU/l)*	229(114~417)	238(84~623)	249(147~437)	274(158~907)
アルブミン(g/ml)*	4.1(2.7~5.1)	4.2(2.3~4.8)	4.0(2.6~4.7)	3.9(2.1~5.2)
Staging(F0, F1, F2, F3, F4)**	1/9/0/1/0	3/17/4/1/0	3/2/2/1/1	0/10/3/4/6
肝硬変(なし/あり)*,***	80/2	256/12	24/11	82/62
肝発癌(あり/なし)*	1/81	15/243	1/34	31/113

BMI: body mass index, PNALT: persistently normal ALT, *: p<0.01, **: p<0.05, ***: 超音波所見から診断.

法)で検討すると、選択されたのは年齢、ALT、血小板、総ビリルビン、ALP、アルブミンの6因子であった(表1)。年齢が増すと、ALTの積分平均値が高いと、血小板が低いと、総ビリルビンが高いと、ALPの積分平均値が高いと、アルブミン値が低いと、発癌率は増加していた。

これらの因子のうちALTと血小板に着目して、①血小板15万/m³以上、ALT20IU/l以下(グループA, n=82)、②血小板15万/m³以上、ALT20IU/lを超える(グループB, n=258)、③血小板15万/m³未満、ALT20IU/l以下(グループC, n=35)、および④血小板15万/m³未満、ALT20IU/lを超える(グループD, n=144)の4つのグループに分けてそれぞれの発癌率をみると、グループDでの発癌率もっとも高く、グループA, B, Cに比べて有意であった(図3)。グループA, B, Cの間には差を認めなかった。4つのグループの背景因子をみるとグループDでは高齢の症例が多く、PNALT例の占める割合は少なく、総ビリルビンとALPは高く、アルブミンは低値で線維化の進んだ例や超音波検査で肝硬変と診断される症例が多かった(表2)。さらに、グループAあるいはBに属する症例で16例に肝発癌を認めたが、12例(75.0%)は発癌前に血小板が15万/m³未満に低下していた。

以上の結果から、C型肝炎の発癌に限ればALTと血小板のcut-off値はそれぞれ20IU/lと15

万/m³であり、また、ALTの値にかかわらず経過観察中に血小板の値が減少してくる症例は要注意と考えられた(「サイドメモ」参照)。また抗ウイルス療法の適応を考慮するにあたっては、もちろん年齢、全身状態を考慮する必要があるが、たとえALTが基準値以下の症例であっても、グループAに属する症例は積極的に治療介入すべきと思われる。

サイド
メモ

基準値とcut-off値(臨床判断値)

数値データとして結果が得られる臨床検査値には、評価するための指標が必要である。通常、①健常集団の測定分布を示す基準値(従来は「正常値」とよばれていたが、あたかも健康状態の指標であるかのような誤解を与えるこの言葉に替えて「基準値」「基準範囲」が用いられるようになった)と、②特定の病態に対する識別指標であるcut-off値(病態識別値)の2つの指標がある。前者には多くの生化学検査値が含まれ、後者には腫瘍マーカーやウイルスマーカーなどが含まれる。しかし、実際に使用するときは両者を混在して使用しているのが現状である。もともと両者の算出方法はまったく異なり、本来は概念を明確に区別して使用すべき指標である。血清ALT値は基準値として使用されることが多いが、この用法には限界がある。C型肝炎の集団のなかで、予後・治療適応を見据えた「病態識別値」の構築が必要と考えられる。

表 3 1型でのALT正常例と異常例での背景因子

	ALT 正常 (n=72)	ALT 異常 (n=91)	p
性(女/男)	37/35	42/49	n. s.
年齢	60(25~74)	59(29~73)	n. s.
前治療(なし/再燃/無効)	34/27/11	38/21/32	0.0104
Grading(A0/A1/A2/A3)	3/46/19/1	2/30/36/10	0.0013
Staging(F0/F1/F2/F3)	7/48/11/3	5/38/22/13	0.0123
ウイルス量(log ₁₀ /ml)	6.2(4.6~6.9)	6.3(3.9~7.1)	n. s.
血色素(g/dl)	13.4(9.4~16.9)	13.9(10.5~18.1)	0.0214
血小板(×10 ³ /m ³)	16.0(8.0~29.4)	13.5(4.3~29.3)	0.0117
γ-GTP(IU/l)	19(9~251)	41(12~531)	<0.0001

γ-GTP : gamma glutamyl transpeptidase.

ALT正常(基準値内)症例の治療成績

ALT 正常例に対する抗ウイルス療法は、いわゆる“寝た子を起こす”状態とならないかという危惧と、治療時に高率にみられる各種副作用の面から、以前は控えられてきた。しかし、ペグインターフェロン(PEG-IFN)+リバビリン療法の実現により著効率が大幅に上昇したこと、副作用への対処法が確立してきたことから、最近では広く行われるようになってきた。とくに Zeuzem らによって大規模臨床試験の結果が報告され¹⁰⁾、“寝た子を起こす”状態にはならないこと、ALT 正常例の治療成績が ALT 異常例と変わらないことが確認され、積極的に行われるようになった。欧米のガイドラインにも ALT 正常例における抗ウイルス療法の適応が明記された¹¹⁾。わが国でも Okanoue らによって ALT 30 IU/l と血小板 15 万/m³を cut-off 値とするガイドラインが作成された¹²⁾。

著者らの施設での治療成績を示す。治療開始時に血清 ALT 値が 40 IU/l 以下の症例を ALT 正常例、それ以外を ALT 異常例とした。PEG-IFN+リバビリン療法を遺伝子型 1 型に対しては 163 例 (ALT 正常 72 例, ALT 異常 91 例)に行った。表 3 に背景因子を示す。ALT 正常例は、grading と staging の軽い例が、血色素と γ-GTP は低い例が、血小板は高い例が多かった(表 3)。また、血清 HCV RNA の陰性化時期は ALT 正常例も異常例も変わりはない。著効率は、ALT 正常例で 72 例中 34 例(47.2%)、ALT 異常例で 91 例中 38 例(41.8%)と、両群間に差は認めなかった(図 4)。一方、遺伝子型 2 型に対しては PEG-IFN+リバビリン療法を 94 例(ALT 正常 62 例, ALT 異常 32

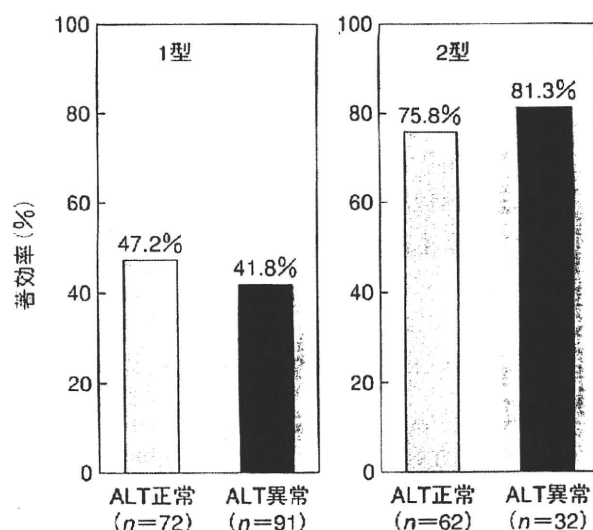


図 4 遺伝子型別のALT正常例・異常例の著効率
遺伝子型 1 型, 2 型とも ALT の異常の有無による著効率の差は認めない。

例)に行った。背景因子では ALT 正常例は女性が多く、ウイルス量は多く、血色素と γ-GTP は低値であった(表 4)。血清 HCV RNA の陰性化時期は ALT 正常例も異常例も差は認めなかった。著効率は、ALT 正常例で 62 例中 47 例(75.8%)、ALT 異常例で 32 例中 26 例(81.3%)と両群間に差は認めなかった(図 4)。

おわりに

HCV キャリアで ALT 正常(基準値内)症例の自然経過と治療効果について、自験例を中心に述べた。肝発痛という観点からみると、ALT 値のみからではなく血小板などの他の検査項目も合わせて勘案し治療適応を決めるべきと考えられた。また、現在の標準的治療である PEG-IFN+リバビリン

表 4 2型でのALT正常例と異常例での背景因子

	ALT 正常 (n=62)	ALT 異常 (n=32)	p
性(女/男)	48/14	12/20	0.0001
年齢	58(21~71)	57(28~72)	n. s.
前治療(なし/再燃/無効)	47/12/3	26/4/2	n. s.
Grading(A0/A1/A2/A3)	1/40/8/2	0/17/8/2	n. s.
Staging(F0/F1/F2/F3)	5/42/8/2	1/16/9/1	n. s.
ウイルス量(log ₁₀ /ml)	6.3(4.1~7.0)	6.0(4.0~7.3)	0.0356
血色素(g/dl)	13.4(8.4~16.4)	14.0(11.5~16.9)	0.0138
血小板(×10 ⁴ /m ³)	18.2(6.3~37.0)	16.7(5.5~30.9)	n. s.
γ-GTP(IU/l)	23(10~201)	50(13~448)	<0.0001

療法の有効率は ALT 正常例と ALT 異常例では変わりなく、“寝た子を起こす”状態となることも少ないことも確認された。一方、日本では C 型肝炎患者の高齢化が進んでいる。異常値を示すまで待って治療機会を逸さないよう、注意して治療開始時期を判断する必要がある。とくに遺伝子型 2 型での著効率は高いので、積極的に行うべきと考えられた。

文献

- 1) Toyoda, H. et al. : Influence of age, sex, and degree of liver fibrosis on the association between serum alanine aminotransferase levels and liver inflammation in patients with chronic hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.*, **49** : 295-299, 2004.
- 2) Prati, D. et al. : Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann. Intern. Med.*, **137** : 1-10, 2002.
- 3) EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J. Hepatol.*, **31** (Suppl. 1) : 3S-8S, 1999.
- 4) Marcellin, P. et al. : Therapy of hepatitis C : patients with normal aminotransferase levels. *Hepatology*, **26** (3 Suppl. 1) : 133S-136S, 1997.
- 5) Kumada, T. et al. : Long-term followup in hepatitis

C patients with an initially normal alanine aminotransferase. *J. Med. Virol.*, 2009. (in press)

- 6) Okanoue, T. et al. : A follow-up study to determine the value of liver biopsy and need for antiviral therapy for hepatitis C virus carriers with persistently normal serum aminotransferase. *J. Hepatol.*, **43** : 599-605, 2005.
- 7) Puoti, C. et al. : Histological and virological features and follow-up of hepatitis C virus carriers with normal aminotransferase levels : the Italian prospective study of the asymptomatic C carriers (ISACC). *J. Hepatol.*, **37** : 117-123, 2002.
- 8) Kumada, T. et al. : Relation between incidence of hepatic carcinogenesis and integration value of alanine aminotransferase in patients with hepatitis C virus infection. *Gut*, **56** : 738-792, 2007.
- 9) Kumada, T. et al. : Incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis C carriers with normal alanine aminotransferase levels. *J. Hepatol.*, 2009. (in press)
- 10) Zeuzem, S. et al. : Peginterferon alfa-2a (40 kilodaltons) and ribavirin in patients with chronic hepatitis C and normal aminotransferase levels. *Gastroenterology*, **127** : 1724-1732, 2004.
- 11) Strader, D. B. et al. : AASLD PRACTICE GUIDELINE. Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology*, **39** : 1147-1171, 2004.
- 12) Okanoue, T. et al. : Guidelines for the antiviral therapy of hepatitis C virus carriers with normal serum on platelet counts. *Hepatol. Res.*, **38** : 27-36, 2008.

* * *

Radiofrequency ablation (RFA) 効果判定における Gd-EOB-DTPA-MRI (EOB-MRI) の有用性—造影エコーと比較して

大垣市民病院 機能診断室*¹ / 同 消化器科*²

小川定信*¹ / 川地敏明*¹ / 船坂佳正*¹ / 石川照芳*¹ / 熊田 卓*²

はじめに

RFAは、電極を病巣に挿入してラジオ波で誘電加熱し、肝細胞癌(HCC)を凝固壊死に陥らせる治療法である。1回の焼灼でPEITに比し確実な凝固壊死が得られ、短い入院期間で治療可能なことから、当院でも適応患者に対し積極的に用い、良好な治療成績を得ている。

RFA後の治療効果判定は、腫瘍の残存(初期濃染)を確認するためdynamic studyによるCTやMRIが有効とされるが^{1,2)}、当院では、より時間分解能が高い造影エコーで詳細な血流評価を試みてきた。造影エコーの利点は、造影剤静注1分までの血管相は15fpsで目的とする病巣を観察し、必要に応じてslice面を変更し、くまなく評価が可能なことである。欠点としては、焼灼後の凝固壊死に伴い腫瘍濃染と炎症性偽濃染の識別が困難になる、また存在深部が深い場合は染影が不十分になる点が挙げられる³⁾。

今回は、2008年2月よりMRI造影剤として新たに加わったGd-EOB-DTPA(EOB)を用いてRFAの効果判定を試み、造影エコーと比較することでその有用性について検討した。

EOBの特性

EOBは常磁性のガドキセト酸ナトリウム(略号:Gd-EOB-DTPA)を有効成分とする肝臓用MRI造影剤である。Gd-DTPAを基本骨格として、側鎖には脂溶性を示すエトキシベンジル基(EOB:ethoxybenzyl)が導入されている。MRI検査で一般に用いられているGd-DTPAは水溶性を示すため、臓器や組織に特異的に分布することはないが、

本剤は脂溶性側鎖であるエトキシベンジル基の導入により、投与された造影剤の一部が肝細胞に取り込まれる。このため肝細胞に造影剤の取り込まれた時相(肝細胞造影相)では、肝細胞機能の廃絶あるいは低下した病巣部と正常肝実質との間に造影剤の分布差が生じることで、病巣を検出することが可能となる。また血管内投与後早期には、Gd-DTPAと同様に非特異的に血管および細胞間隙に分布するため、肝腫瘍の診断ではdynamic studyによる腫瘍の血流動態を評価することが可能である。

このことからEOB-MRIによる効果判定は、dynamic studyによる初期濃染を評価し、その後の肝細胞造影相で焼灼範囲を正確に把握することが可能である。

EOB-MRIの撮影方法

MRIの使用装置は『Achieva 1.5T Nova』(PHILIPS社製)で、撮影シーケンスは肝腫瘍の診断に使用するものと同様とし、撮影順やパラメータなどの詳細は表に示す。造影前はT1WI(double echoおよび脂肪抑制)を撮影した。造影剤は速度1mL/secで、総量を体重×0.1mL注入しbolus truckで下行大動脈が濃染されるのを確認後(図1a)、dynamic studyで動脈・門脈を各2相(計4相)撮影した(図1b~d)。肝細胞造影相の撮影タイミングは、当院の検討⁴⁾では20分以降で良好な結果を得たため、今回もそれに準じた。

評価方法

EOB-MRIのdynamic study(動脈相)では残存

表 EOB-MRIの撮影パラメータ

撮像画像	撮像法	Time (sec)	TR (msec)	TE (msec)	FA (°)	slice厚 (mm)	Gap (mm)	slice数	Matrix	scan (%)	FOV (mm)	RFOV (%)	SENSE factor	K-space ordering	Band Width
T 1 強調画像	FFE in / out	16	149	in 4.6 out 2.3	75	7	1	20	320×512	70	380	70	1.6	Sequential	541
T 1 強調画像 脂肪抑制	TFE	11	3.5	1.72	12	3.5	0	50	256×512	78	380	70	1.7	Centric	620
Dinamic Study 脂肪抑制	TFE	10 × 4	3.5	1.72	12	3.5	0	50	256×512	78	380	70	1.7	Centric	620
T 2 強調画像 脂肪抑制	TSE multi shot	呼吸 同期	1200	100	90	7	1	20	400×512	70	380	70	1.6	Sequential	207
T 2 強調画像	TSF single shot	呼吸 同期	369	80	90	7	1	20	256×256	80	380	70	1.5	Sequential	526
肝細胞造影相	TFE	20	4.2	2	12	3.5	0	50	240×512	100	380	70	2.2	Centric	434

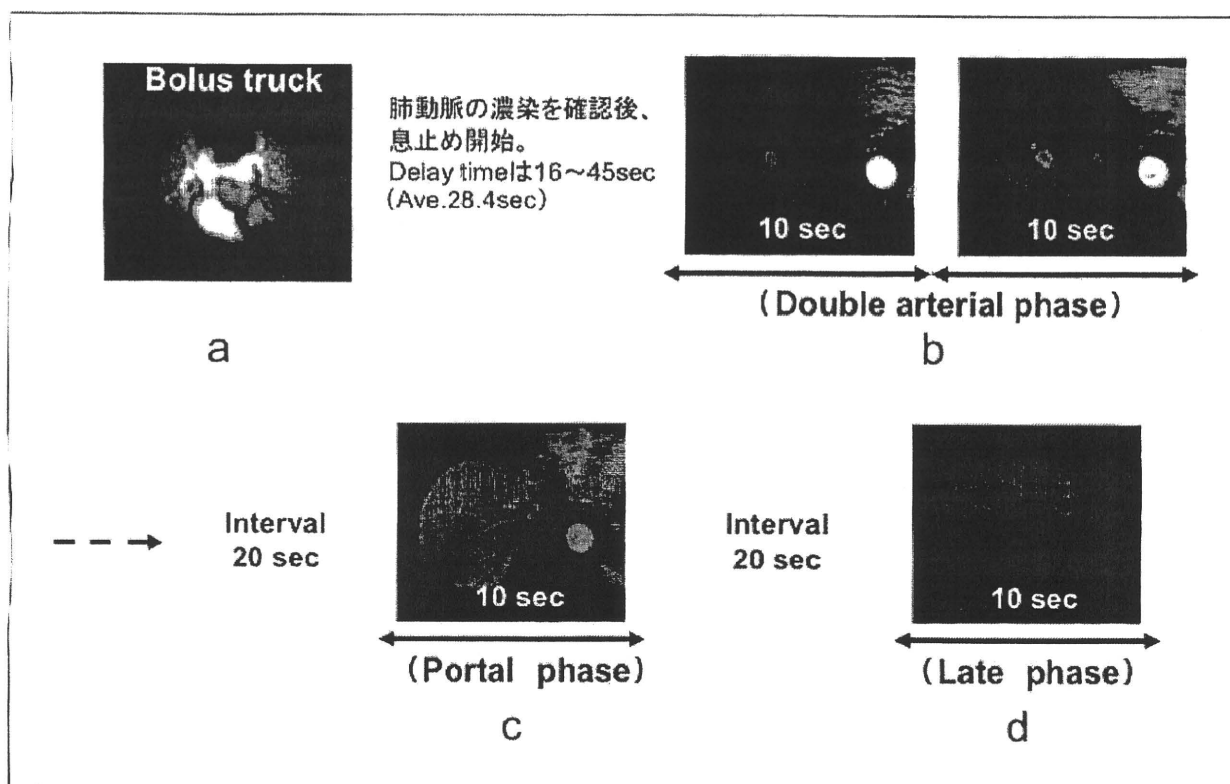


図1 EOB-MRIのdynamic studyの撮影時相

Bolus truckにより造影剤の移行を確認後(a)、動脈相として2相撮影(b)。なお1~2相のintervalはなし。門脈相(1相目)は、動脈相撮影後20secのintervalをとる(c)。同様に2相目も、1相目を撮影後、20secのintervalをとる(d)。

する腫瘍濃染の有無を、肝細胞造影相では凝固壊死の位置と大きさを評価して効果判定を行い、造影エコーの結果と比較した。なお、RFA施行後の凝固壊死はT1WIにて高信号を示すため⁵、微

細な濃染が認識困難になることが懸念される。そこで、造影剤の信号のみで評価するため、dynamic studyおよび肝細胞造影相の各相で差分画像を作成し、診断の一助とした。

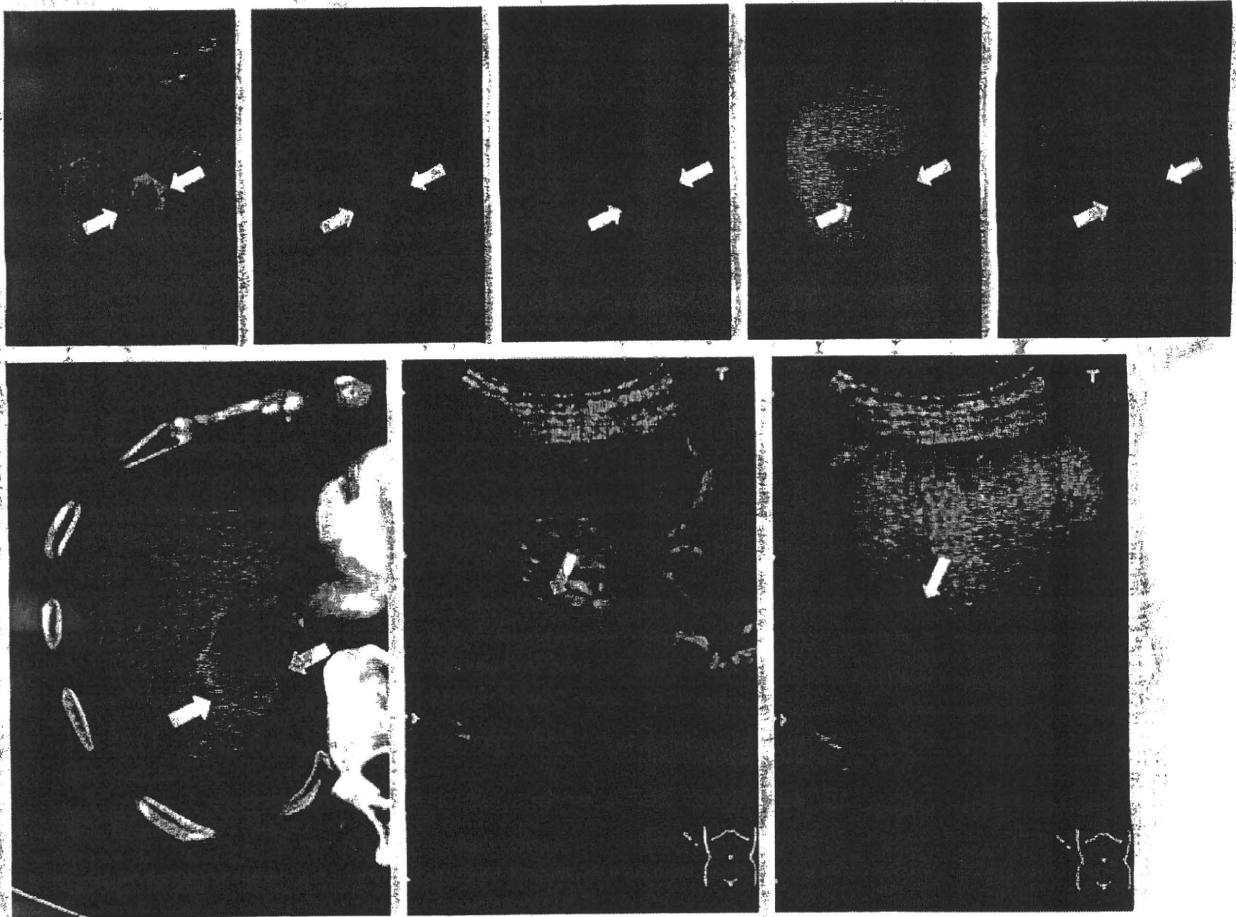


図2 症例1：転移性肝癌（大腸癌）

a：T1WI b：動脈1相 c：動脈1相（差分画像） d：肝細胞造影相
 e：肝細胞造影相（差分画像） f：CT画像（動脈相） g：造影エコー（血管相）
 h：造影エコー（肝細胞造影相）

図2a | 図2b | 図2c | 図2d | 図2e
 図2f | 図2g | 図2h

T1WIで焼灼部は不均一な高信号を呈す(a)。動脈1相目では内部の高信号と濃染の識別が困難であるが(b)、差分画像では焼灼部に濃染がないことが容易に判定できる(c)。動脈相で認められた周囲の濃染は、肝細胞造影相(d)でも濃染を示し偽濃染であると判定できる。なお、差分画像(e)では内部の信号が消失し、さらに焼灼部の辺縁が明瞭となった。これらの結果より治療前に確認された局所再発(f)は焼失し、効果良好と判定された。造影エコーでも血管相(g)と、後血管相(h)でも焼灼部に染影を認めず、効果良好と判定された。

IMAGE PREVIEW 参照

症例提示と解説

1) 転移性肝癌（大腸癌：図2）

以前の治療部に局所再発が指摘され、RFAが施行された。造影前のT1WI、通常の動脈相では治療内部に高信号領域を認め(図2a)、造影効果の詳細については不明であったが、動脈相から造影前を差分した画像では造影剤のみの信号とな

り、治療内部に血流がないことが確認された(図2c) また、治療部周辺に認められる濃染が腫瘍の残存もしくは偽濃染かの判定方法は、肝細胞造影相で容易であった。つまり肝細胞造影相では、炎症を含めた正常肝細胞の分布を示すため、動脈相で濃染し肝細胞造影相で欠損像を示した部分は腫瘍の残存、動脈相および肝細胞造影相で濃染を示した部分は偽濃染と考えられる。本ケースは後

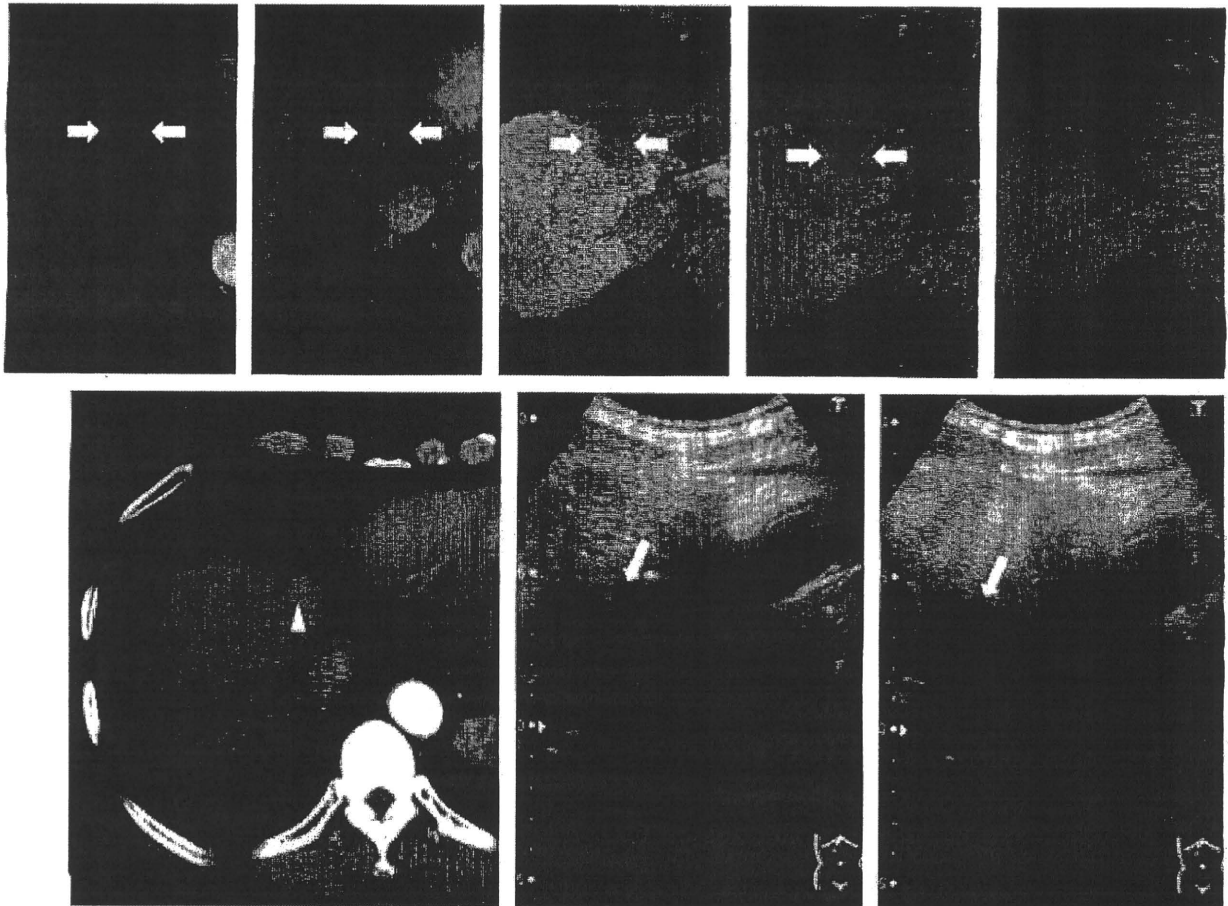


図3 症例2：HCC

a：動脈1相 b：動脈1相（差分画像） c：肝細胞造影相

d：肝細胞造影相（差分画像） e：今回の治療部肝細胞造影相（差分画像）

f：CT画像（動脈相） g：造影エコー（血管相） h：造影エコー（肝細胞造影相）

動脈1相目(a)および差分画像(b)にて、CT(f)と一致して腫瘍濃染を認めた。肝細胞造影相(c)および差分画像(d)でも低信号を示し、HCCの所見を呈した。腫瘍よりやや下方に今回の焼灼部が低信号として描出された(e)。なお、造影エコーでは血管相(g)、後血管相(h)ともに染影が確認されず、効果良好と判定された。

図3a | 図3b | 図3c | 図3d | 図3e
図3f | 図3g | 図3h

IMAGE PREVIEW 参照

者に当たるため、偽濃染と判定した。

なお肝細胞造影相の差分画像でも、治療部と正常部との境界および治療内部がより明瞭化され、正確な診断が可能であった。造影エコーでも治療内部に明らかな染影を認めず、EOB-MRIと同様の結果であった(図2g~h)。

2) 肝細胞癌(図3)

CTにてHCCが指摘され、治療としてRFAが

選択された。先に施行された造影エコーでは明らかな腫瘍の染影が確認されず、効果良好と判定された(図3g~h)。一方EOB-MRIでは、dynamic studyの動脈相で術前のCT画像と一致した部位に濃染を認めた(図3a)。差分画像でも同様の所見であった(図3b)。したがって本ケースは効果不良と判定されたが、エコーで観察困難な部位においても容易に正確な判定が可能である。なお、

今回RFAにより焼灼された部位は、肝細胞造影相にて明瞭な低信号を示すことから、HCCとわずかに位置の相違を生じているのが確認された(図3e)。

考察

1) EOB-MRIの利点

①EOBをRFAの効果判定に使用する際、従来のGd-DTPAと同様にdynamic studyによる血流情報から判定可能であることに加え、肝細胞造影相では治療部の形態を正確に評価することができた。MRIに限らず、他のモダリティでも治療後に認める偽濃染の判定は容易ではなく、特にsafety marginの判定に苦慮するケースがある。今回のケースでは、肝細胞造影相はRFAにより凝固壊死に陥った場所、範囲を正確に描出したため、動脈相と比較することで容易に偽濃染を判定できた。

②造影剤の信号を評価する上で妨げとなる凝固壊死の信号は、造影前の画像で差分することにより除去が可能で、dynamic studyや肝細胞造影相でより微細な評価ができると期待される。なお、差分画像については効果判定に限らず、通常の診断を目的とした検査でも有用な手法と思われる。

③エコーで観察困難な部位においても、腫瘍濃染の有無や、焼灼箇所の確認が正確に行える。

2) EOB-MRIの問題点と対策

①MRIは、MDCTのように短時間で検査を施行できず、撮影シーケンスの種類や数によっては30分近く患者を拘束することになる。特にEOBを用いた肝細胞造影相では、造影剤静注20分前後の間隔を空ける必要があるために長時間の検査

となり、スループットが悪いのは本検査の最大の欠点といえる。

②EOBのT1短縮作用は同濃度のGd-DTPAより強いため、注入量も1/2に設定されるが、dynamic studyにおける視覚的な濃染効果はやや弱い印象がある。またトランケーションアーチファクト(リング状の縞模様)などによる画像劣化もまれに経験するため、特にdynamic study時のパラメータ、造影剤の注入条件は、最適化を図るべくさらなる検討が必要である。

③差分画像がEOB-MRIにおいて有用な手法であることはすでに述べたが、造影前後で画像のズレが生じた場合は、適切に差分ができず診断が不可能となる。現時点でこのズレを補正するソフトは存在しないため、検査時に呼吸停止に関する患者への説明が重要である。

④通常、悪性肝腫瘍は肝細胞造影相で低信号を示し、正常部との信号は異なるが、まれに等信号もしくは高信号を示す腫瘍も認めるため、治療前にEOB-MRIを施行し、腫瘍の信号を確認しておく必要がある。

おわりに

EOBを用いることで、MRI検査に肝細胞造影相というカテゴリが新たに加わった。これにより正常肝細胞の分布を把握できるため、従来法の血流情報を加えることで、質的診断のみならず治療効果判定においても多角的な評価が可能となった。EOB-MRIは、MRIそのものもつ問題点は数点認めるが、ハード・ソフト面の発展で解消されることが多く、今後の治療効果判定のスタンダードとなり得る検査法と思われる。

参考文献

- 1) Lim HK et al: Hepatocellular carcinoma treated with percutaneous radio-frequency ablation: evaluation with follow-up multiphase helical CT. *Radiology* 221(2): 447-454, 2001
- 2) Catalano O et al: Multiphase helical CT findings after percutaneous ablation procedures for hepatocellular carcinoma. *Abdom Imaging* 25(6): 607-614, 2000
- 3) 乙部克彦 ほか: 超音波造影剤ソナゾイドにおけるRFAの治療効果判定の有用性. *映像情報メディカル* 40(8): 704-708, 2008
- 4) 小川定信 ほか: Gd-EOB-DTPA(EOB)による肝細胞造影相の撮影時相について(肝機能との比較). 第36回日本磁気共鳴医学大会 演題抄録集: 284, 2008
- 5) 加藤博基 ほか: CT・MRIによるTAE・局所療法の効果判定. *消化器病セミナー*・97: 127-137, 2004

ソナゾイドによる ルーチン造影超音波 検査

症例に見る
診断から治療までの
流れ

01-1

肝腫瘍診断における ソナゾイド造影超音波検査の 症例ケーススタディ

大垣市民病院消化器科
高木万起子/熊田 卓

大垣市民病院医療技術部
診療検査科形態診断室
竹島賢治/乙部克彦/高橋健一

第二世代の超音波造影剤であるソナゾイドは、外殻にシェルを有し、超音波に対して安定したマイクロバブルであり、持続的な造影効果（血管イメージングならびにKupfferイメージング）が得られる。造影CTと同等、もしくはそれを凌駕する造影効果が得られ、ベットサイドでも施行可能であり、簡便かつ安全な検査法で

ある。これまでわれわれは、肝腫瘍のスクリーニングはBモードを中心に行ってきたが、さらに確実に腫瘍を検出、正確な病変範囲を同定、かつ質的診断を高めるため、ソナゾイドを用いた超音波検査をルーチン検査に組み込み施行している。本稿では、当院の肝腫瘍の診断体系を、症例を示しながら説明する。

検査の流れと選択の考え方

肝腫瘍診断の流れは、いままでは図1に示すように、『科学的根拠に基づく肝臓診療ガイドライン 2005年版』や『肝臓診療マニュアル』に沿ったものであった^{1),2)}。Bモードを中心に行い、必要に応じて定期的にMRIやCTを組み込み、超音波検査の死角を補ってきた。結節

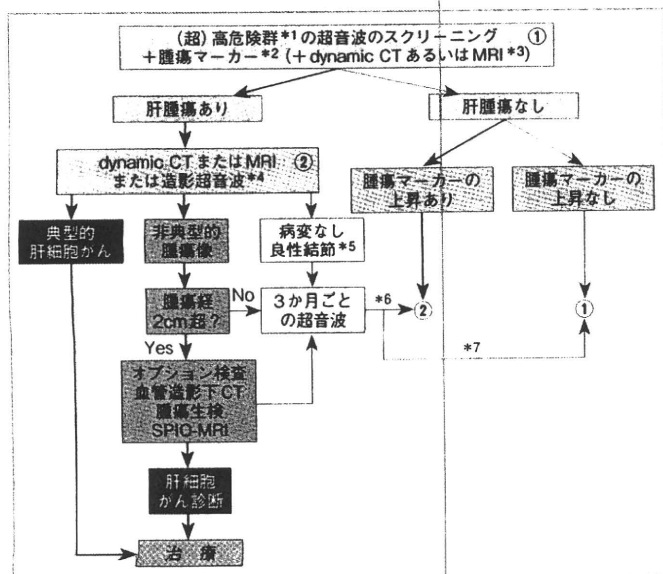


図1 いままでの肝腫瘍診断の流れ

- * 1: 高危険群はB型肝炎、C型肝炎、肝硬変、超高危険群はB型肝炎、C型肝炎。高危険群は原則として6か月に一度、超高危険群は原則として3か月に一度検査を行う。
- * 2: 腫瘍マーカーはAFP、PIVKA II、AFP-L3分画の3種類。AFP-L3分画は肝がんの病名必要。
- * 3: dynamic CTあるいはMRIは、超音波検査の死角を補うために定期的（6～12か月くらいの間隔）に行う。
- * 4: ヨードアレルギーのある場合はdynamic MRI、腎障害のある場合は造影超音波が推奨される。
- * 5: 良性結節の場合は、症例に応じて適宜経過観察。
- * 6: 腫瘍のサイズアップ、もしくは腫瘍マーカーの上昇を認める場合は②に移行する。
- * 7: サイズアップがないか消失の場合は①に移行する。

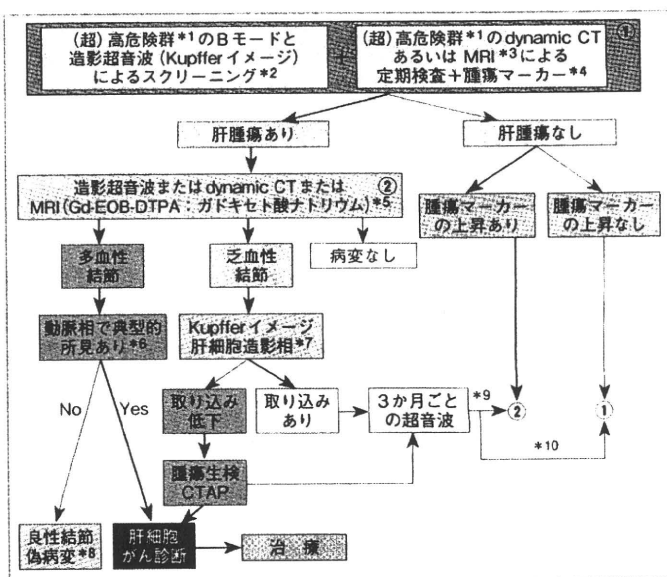


図2 これからの肝腫瘍診断の流れ

- * 1: 図1の*1に同じ。
- * 2: 超音波検査の前にソナゾイドを静注し、Kupfferイメージの撮像のみを行う。同時にBモード（モニター画像）の撮像もできる。
- * 3: 図1の*3に同じ。 * 4: 図1の*2に同じ。
- * 5: 図1の*4に同じ。
- * 6: 肝細胞がんでは動脈相で濃染し、門脈相では低吸収域となる。超音波ではdefect像。
- * 7: 造影超音波のKupfferイメージはKupffer細胞の多寡を、MRIの肝細胞相はGd-EOB-DTPAは結節内への造影剤の取り込みと排出のバランスを反映して像が構成される。
- * 8: シャントなどの偽病変では、一般に後血管相や肝細胞造影相における画像は影響を受けないので鑑別に有用である。
- * 9: 図1の*6に同じ。 * 10: 図1の*7に同じ。

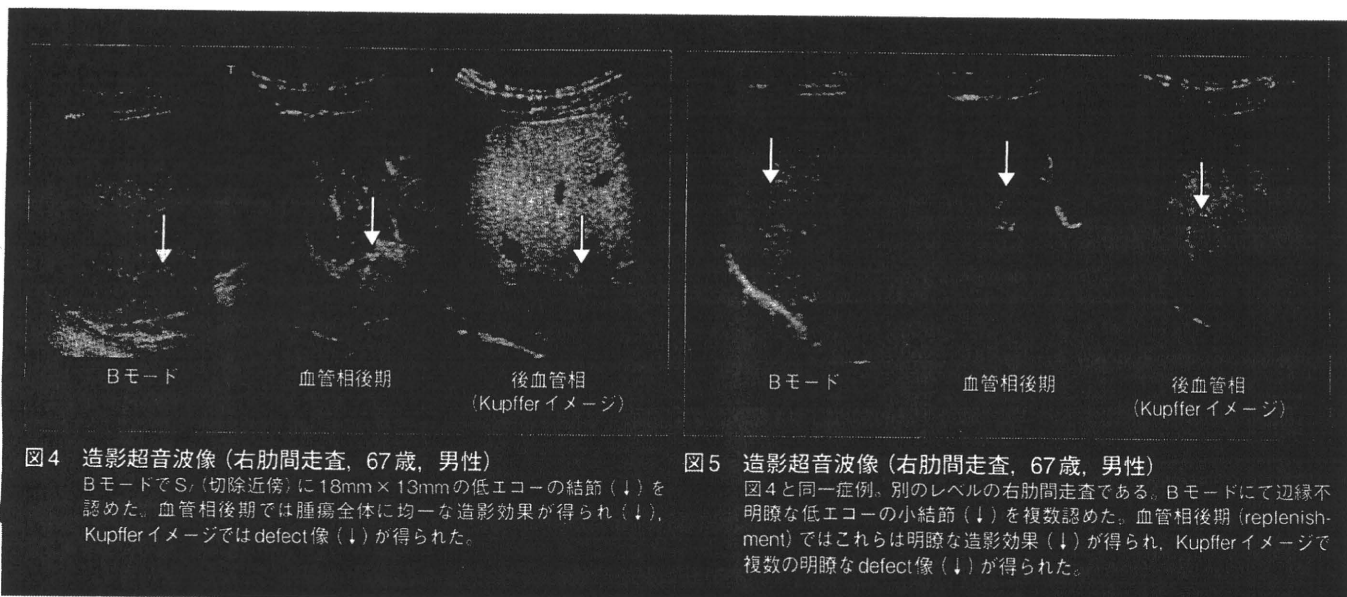


図4 造影超音波像(右肋間走査, 67歳, 男性)
BモードでS₇(切除近傍)に18mm×13mmの低エコーの結節(↓)を認めた。血管相後期では腫瘍全体に均一な造影効果が得られ(↓)、Kupfferイメージではdefect像(↓)が得られた。

図5 造影超音波像(右肋間走査, 67歳, 男性)
図4と同一症例、別のレベルの右肋間走査である。Bモードにて辺縁不明瞭な低エコーの小結節(↓)を複数認めた。血管相後期(replenishment)ではこれらは明瞭な造影効果(↓)が得られ、Kupfferイメージで複数の明瞭なdefect像(↓)が得られた。

表1 症例提示

年齢・性別	67歳, 男性
既往歴	2000年にB型肝炎キャリアを指摘。 肝細胞がんにて肝S ₇ 切除+胆嚢摘除術(2008年)
現病歴	2008年4月に肝細胞がんに対する肝切除を受け、以後外来で経過観察中であった。 同年8月、Bモードにて肝切除近傍に低エコー結節を認め、再発を疑い精査となった。

表2 ソナゾイド造影超音波検査の撮像条件

使用装置	AplioXG (東芝社製)
投与量	0.0075mL/kg (添付文書の用量0.015mL/kgの半量)
プローブ	PVT-375BT (コンベックス型)
M _I 値	0.21 ~ 0.34
フレームレート	11 ~ 15Hz

が認められた場合は、血流画像を得るためにdynamic CTまたはMRI、または造影超音波検査(レボビスト)を行っていたが、造影超音波はオプション検査の感が強く、腎障害例や造影剤アレルギー例を中心に使用されていた。これらの血流画像で典型的な肝細胞がんの画像が得られれば治療に移行した。また、非典型腫瘍像の場合は、2cmを超える結節ではオプション検査として、血管造影下CT(特に経動脈性門脈造影下CT:CTAP)や肝生検で診断と治療必要度(悪性度)を確定し、治療適応を決めていた。

しかし最近では、ソナゾイドとGd-EOB-DTPA(ガドキセト酸ナトリウム)が使用可能となり、診断体系は大きく変化した。血流画像に加えて安定した機能画像(Kupfferイメージおよび肝細胞イメージ)が得られるようになったからである。

最近の肝腫瘍診断の流れを図2に示す。血流画像と機能画像を適宜組み合わせ、より質の高い診断体系が構築できる。すなわち、患者の拾い上げの部分(存在診断)で、ソナゾイドを投与した後血管相(Kupfferイメージ)が組み込まれている。ただし、ソナゾイドを静注し、血

管相を撮像すると、人手と時間もかかりルーチン検査とはなり得ない。このためわれわれは、ルーチン化を目的として血管相は撮像せずKupfferイメージのみに焦点を絞り、処置室で生理食塩水50mLまたは100mLにソナゾイド0.0075~0.015mL/kgを懸濁して、一般の点滴と同じように投与して対応している。患者は、点滴終了後抜針し、超音波検査の待機中に、撮像タイミングとして望まれる30分以上が経過する。もちろん、死角を補う意味で定期的にMRIやCTは組み込んでいる。そして、腫瘍をとらえた場合には、まず血流画像を得るために、造影超音波、そしてdynamic CTまたはMRIを行う。ここ

で、肝細胞がん特有の血流画像が得られれば治療に移行するが、乏血性結節の場合には機能画像の情報が重要となる。肝細胞がんは分化度(悪性度)により、微妙に血流画像(動脈血流と門脈血流)と機能画像(Kupffer細胞と肝細胞)の解釈が異なる(図3)。ソナゾイドで欠損を示す結節と、Gd-EOB-DTPAで低信号を示す結節に乖離を認める場合もあるが、より精度の高い診断が可能となる。

ソナゾイドが有用であった67歳、男性、B型肝炎キャリア、肝細胞がん切除後の症例を提示する(表1)。ソナゾイド造影超音波検査の撮像条件は表2のとおりである。Bモードでは、下大静脈

組織診断	再生結節	軽度異型結節	高度異型結節	早期肝細胞癌	高分化型肝細胞癌	中低分化型肝細胞癌
	動脈血流(MDCT/MRI/ソナゾイド/CTHA)	等~乏血性			減少	
門脈血流(CTAP)	等血流			低血流~欠如		
Kupffer細胞(ソナゾイド/SPIO)	存在			減少		欠如
肝細胞(Gd-EOB-DTPA)	取り込み			取り込み低下~欠如		

図3 肝硬変に伴う結節性病変の画像所見(概念図)

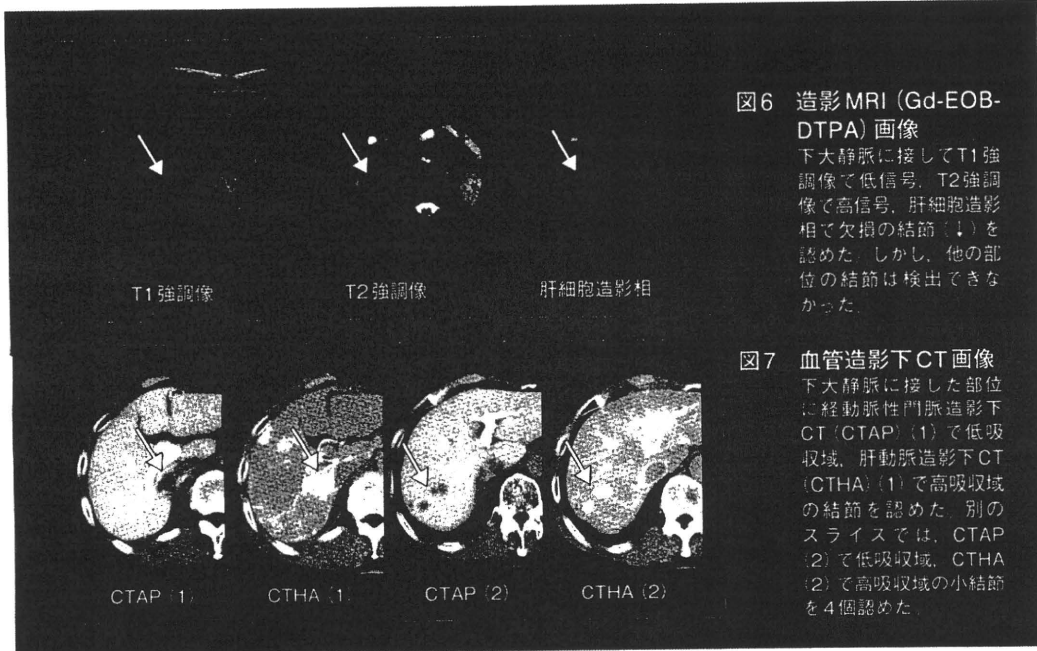


図6 造影MRI (Gd-EOB-DTPA) 画像

下大静脈に接してT1強調画像で低信号、T2強調画像で高信号、肝細胞造影相で欠損の結節(↓)を認めた。しかし、他の部位の結節は検出できなかった。

図7 血管造影下CT画像

下大静脈に接した部位に経動脈性門脈造影下CT (CTAP) (1)で低吸収域、肝動脈造影下CT (CTHA) (1)で高低吸収域の結節を認めた。別のスライスでは、CTAP (2)で低吸収域、CTHA (2)で高低吸収域の小結節を4個認めた。

近傍の結節は同定できたが(図4)、他部位の小結節は不明瞭にしか描出されず確定診断は困難であったが、造影を加えることで結節は明瞭に描出された(図5)。同時期に行ったMRIでは、下大静脈近傍の結節をとらえることはできたが、他の部位の結節は不明であった(図6)。血管造影下CT (CTA) では典型的な肝細胞がんの造影パターンを示し、造影超音波の所見が裏付けられた(図7)。

ソナゾイド造影超音波検査の有用性

ソナゾイドによる造影超音波検査の目的は、肝腫瘍の①質的診断、②存在診断(腫瘍の広がりも含める)、③治療効果判定、④治療支援(ラジオ波焼灼療法: RFA、経皮的エタノール局注療法: PEIT)に分けられる。

ウイルス性肝炎など慢性肝疾患の患者に対しては、まず、肝腫瘍のスクリーニングのためKupfferイメージによる存在診断を中心に行い、腫瘍の存在が明らかになった場合、後日、確定診断のために血管相を撮像して質的診断を実施している。

また、血管腫や限局性結節性過形成(FNH)では、腫瘍内の血流がより明瞭に描出され、確定診断につながる。転移性肝がんでは、造影CTでは検出できない微小病変の検出も可能である。

ただし、超音波検査で死角となるド-

ムや深部の腫瘍、また、高分化型肝細胞癌では、Kupffer細胞を有するためKupfferイメージによる存在診断は困難となり、注意を要する。

以上のとおり、ソナゾイドは診断から治療までの幅広いシーンで用いることができ、さらにKupfferイメージによる存在診断では簡便性も高い。よって、ソナゾイドを用いた造影超音波検査は、MRIなどの他の検査に匹敵する有用な検査であり、かつ安全性も考慮すると、それらを凌駕する検査とも言える。

ルーチン化へのアドバイス

当院では、造影超音波検査を、Kupfferイメージによる存在診断と、血管相とKupfferイメージ両者による質的診断の2つに大別している。電子カルテでのオーダーは、前者を肝造影メタ・HCC検索、後者を造影エコー(臓器名)と呼んでいる。各検査の実施手順は以下のとおりである。

肝造影メタ・HCC検索オーダー

医師は患者に卵アレルギーの有無を確認し、検査とソナゾイド注射を指示する。外来処置室で(入院の場合は病棟で)ソナゾイドを点滴静注し、抜針して検査室に向かう。検査室では、技師がソナゾイド投与時間を確認した後、手順に従い全肝をスキャンする。必要があれば、後日、血管相も含めた再評価を行う。

造影エコー(臓器名) オーダ

こちらも同様に、検査と血管確保用薬剤の注射を指示し、血管確保後に検査室に向かう。検査室では、Bモードで確認できる結節を検索してターゲットを決め、ターゲットの血流動態をドプラーで把握する。次に、患者に呼吸や位置決め練習をしてもらう。最終的にゲインやSTCなどを調整し、造影剤を作成した後、造影検査を開始する。血管相早期(静注開始より15~30秒後)、血管相後期(静注開始より20~60秒後)、

replenishment・MFI (micro flow imaging)、後血管相(Kupfferイメージ)をそれぞれ観察する。

まとめ

当院では、診療放射線技師あるいは臨床検査技師が主体となり、数多くの超音波検査を施行している。Kupfferイメージによる存在診断のみであれば、Bモードと同じ感覚でオーダーでき、腫瘍が見つかった場合は、後日、血管相を含めた質的診断を追加している。この方法であれば、多くの患者に検査を施行することができる。まずは、簡便なKupfferイメージによる存在診断(当院では肝造影メタ・HCC検索)オーダーを始めていくことが、ルーチン化への第一歩であると確信している。

最後に、造影超音波検査の普及を阻む第一の要因に、対応機器が高額なことがある。CTやMRIでの検査が困難な中小規模病院でこそ、造影超音波検査が生かされると思う。メーカー各社にはできるかぎり価格を抑えてもらい、多くの施設で造影超音波検査が行われることを念じてやまない。

参考文献

- 1) 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班編: 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン、東京、金原出版、9、2005。
- 2) 社団法人日本肝臓学会編: 肝癌診療マニュアル、東京、医学書院、47~62、2007。

HEPATOLOGY

Prevalence and clinical characterization of patients with acute hepatitis B induced by lamivudine-resistant strainsKazuhiko Hayashi,* Yoshiaki Katano,* Masatoshi Ishigami,* Akihiro Itoh,* Yoshiki Hirooka,* Isao Nakano,* Kentaro Yoshioka,[†] Motoyoshi Yano,[‡] Hidenori Toyoda,[§] Takashi Kumada[§] and Hidemi Goto*

*Department of Gastroenterology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, [†]Division of Liver and Biliary Diseases, Department of Internal Medicine, Fujita Health University, Toyoake, [‡]Department of Gastroenterology, Yokkaichi Municipal Hospital, Yokkaichi, and [§]Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, Ogaki, Japan

Key words

acute hepatitis, genotype, hepatitis B virus, lamivudine.

Accepted for publication 26 August 2009.

Correspondence

Yoshiaki Katano, Department of Gastroenterology, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan. Email: ykatano@med.nagoya-u.ac.jp

Abstract

Background and Aims: Acute hepatitis caused by lamivudine (LMV)-resistant strains has not been reported, and the clinical impact of LMV-resistant strains on acute hepatitis is not known. The aim of this study was to investigate the molecular and clinical characteristics of patients with acute hepatitis B caused by LMV-resistant strains.

Methods: Forty-five patients with acute hepatitis B were studied. Hepatitis B virus (HBV) subgenotypes and LMV-resistance mutations were determined by direct sequencing of the preS and polymerase regions, respectively.

Results: HBV subgenotypes A2 ($n = 18$), B1 ($n = 1$), B2 ($n = 3$), B3 ($n = 2$), C1 ($n = 1$), C2 ($n = 19$) and C6 ($n = 1$) were detected in patients with acute hepatitis. LMV-resistance mutations were detected in two patients. LMV-resistance mutations (L180M, M204I) were detected in a patient with subgenotype C2 who had acute self-limited hepatitis. The other patient with LMV-resistance mutations (L180M, M204V) was infected with subgenotype A2 and had severe hepatitis.

Conclusion: LMV-resistant strains are rare, but they are starting to be found in patients with acute hepatitis B. Surveillance for detecting drug-resistant HBV strains would be important for clinical practice.

Introduction

Approximately 350 million people worldwide are infected with hepatitis B virus (HBV).¹ HBV infection causes a variety of clinical courses, such as self-limited acute hepatitis, fulminant hepatic failure, chronic hepatitis, and progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma.² Therefore, HBV infection is one of the most important global health problems. Most countries have performed universal vaccination to prevent HBV infection, but only high-risk groups, such as health-care workers and household contacts of HBV carriers, have received HBV vaccination in Japan.³ Therefore, acute hepatitis is still a major problem in Japan. The frequencies of HBV strains that are rare in Japan have increased among Japanese patients with acute hepatitis B.⁴⁻⁶ The distributions of the HBV strains in acute hepatitis are variable due to the changing social environment. Along the same lines, a study investigated acute hepatitis B induced by lamivudine (LMV)-resistant HBV strains, but acute hepatitis caused by an LMV-resistant strain has not been found, and the clinical impact of LMV-resistant strains on acute hepatitis is still unknown.⁷ Surveillance of HBV strains associated with acute hepatitis B has been continued, and LMV-

resistant strains have begun to be detected in patients with acute hepatitis B. Thus, the present study reports the clinical characteristics of patients in Japan with acute hepatitis B caused by LMV-resistant HBV strains.

Materials

Forty-five Japanese patients with acute hepatitis B who were treated at Nagoya University Hospital, Ogaki Municipal Hospital, Tosei Hospital, Yokkaichi Hospital, and Fujita Health University Hospital were enrolled in this study between January 2006 and September 2008. The patients were 37 men and eight women, with a mean age of 38.6 ± 12.9 years (range, 18–84 years). There were no patients who had received HBV vaccine. Acute hepatitis B was diagnosed as follows. Each patient had high titers of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and immunoglobulin (Ig)M class antibody against HBV core antigen, elevated serum levels of alanine aminotransferase and absence of antibodies against other causative viruses, such as hepatitis A virus, hepatitis C virus, Epstein–Barr virus and cytomegalovirus. It was necessary to discriminate

between initial HBV infection and acute onset or reactivation of chronic HBV infection. Thus, serum HBsAg levels noted in previous medical records, blood donation screening, labor and delivery screening, or employment health screening, were obtained or were followed until negative of HBsAg and/or positive of hepatitis B surface antibody (HBsAb). No patients were using chemotherapeutic and immune modulating agents involved in HBV reactivation. Informed consent was obtained from all patients, and the study was carried out in accordance with the 1975 Helsinki Declaration. Serum was stored at -80°C for virological examinations.

Assay methodology

Hepatitis B virus DNA was isolated from peripheral blood with a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Nested polymerase chain reaction (PCR) analysis and direct sequencing of the preS, polymerase and precore/core regions were performed as reported previously.⁷ In brief, each 50- μL PCR reaction contained 100 nM each primer, 1 ng template DNA, 5 μL GeneAmp 10 \times PCR buffer, 2 μL deoxyribonucleotide triphosphate and 1.25 U AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers were: preS region sense 5'-TCACCTATICTTGGGAACAAGA-3' and antisense 5'-GGCACTAGTAAACTGAGCCA-3'; polymerase region, sense 5'-CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3' and antisense 5'-GGTTGAGTCAGCAAACACACTTG-3'; and precore/core region, sense 5'-ATGTCGACAA CCGACCTTGA-3' and antisense 5'-GTATGGTGAGGTGAAC AATG-3'. Amplification conditions consisted of 5 min at 94°C followed by 40 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for 1 min in a thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems). The second PCR was done in the same reaction buffer with the first-round PCR product as template and the following sets of primers: preS region, sense 5'-TCACCTATICTTGGGAACAAGA-3' and antisense 5'-AGAAGATGAGGCATAGCAGC-3'; and polymerase region, sense 5'-GGATGTGTCTGC GGCGTTT-3' and antisense 5'-ACCCCATCTTTTTGTTTTGTTAGG-3'. PCR products were detected by electrophoresis on 2% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. PCR products were then purified and sequenced with the second-round PCR primers with a dye terminator sequencing kit (BigDye Terminator ver. 1.1 Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems) and an ABI 310 DNA Sequencer (Applied Biosystems). The neighbor-joining method⁸ was used for phylogenetic analysis of the preS region to identify HBV subgenotypes. The bootstrap test with 1000 replicates was performed to confirm the reliability of the phylogenetic tree.⁹

Results

The results of the phylogenetic analyses of HBV subgenotypes of the 41 patients are shown in Figure 1. The HBV subgenotypes A2 ($n = 18$), B1 ($n = 1$), B2 ($n = 3$), B3 ($n = 2$), C1 ($n = 1$), C2 ($n = 19$) and C6 ($n = 1$) were detected. The prevalence of subgenotype A2 was increased, as previously reported. LMV resistance-associated mutations were detected within the HBV polymerase region (positions 116–214) by direct sequencing. Alignment of the amino acid sequence of the HBV polymerase region with LMV resistance-associated mutations was analyzed, and LMV-associated mutations could be detected in two patients at acute hepatitis onset.

LMV-resistance mutations (L180M, M204I) were detected in a patient with subgenotype C2. The other patient with subgenotype A2 had LMV-resistance mutations (L180M, M204V). There were no resistant HBV mutants for other nucleoside/nucleotide analogs such as V173L, L180M or M204V/I. The clinical and virological characteristics of patients with LMV-resistant HBV strains are summarized in Table 1.

Discussion

Hepatitis B virus reverse transcriptase is an error-prone enzyme without proofreading capacity, and it is easy for frequent mutations to occur during viral replication. As a result, there are many well-known mutations that are associated with the pathogenesis of HBV infection.¹⁰ LMV-resistant strains that have mutations in the polymerase region are induced by long-term administration of LMV.^{11,12} LMV had been used widely for treatment for chronic hepatitis B and was available from 2000 in Japan. LMV-resistant strains have emerged in patients with chronic hepatitis. However, the prevalence and clinical impact of LMV-resistant strains in patients with acute hepatitis B are unknown. Thus, surveillance of LMV-resistant strains associated with acute hepatitis B had been conducted, but LMV-resistant strains could not be detected in 2006.⁷ The possibility of acute hepatitis B caused by LMV-resistant strains exists, and the surveillance has continued. Of 45 patients with acute hepatitis, two were found to have LMV-associated mutations. We previously hypothesized that LMV-resistant strains may not have enough power to cause acute hepatitis. However, the present study demonstrated that LMV-resistant strains would have infectivity and would be capable of causing acute hepatitis. Less opportunity for infection may explain why previous studies failed to find acute hepatitis caused by LMV-resistant strains.

The infectious source of the LMV-resistant strains could not be confirmed. The subgenotypes of the patients infected with LMV-resistant strains were subgenotype A1 and C2, respectively. The patient infected with subgenotype C2 plus LMV-resistant strain had a history of sex with a prostitute 1 month before admission. Subgenotype C2 was the predominant subgenotype found in Japanese patients with chronic hepatitis B.^{7,13–15} The infectious source would be a chronic hepatitis patient who developed resistant HBV mutants during long-term LMV treatment. The route of infection for the other patient with subgenotype A2 was unknown. HBV subgenotype A2 has been rarely reported in Japanese patients with chronic hepatitis B. However, subgenotype A2 has been increasing and has become responsible for the majority of patients with acute hepatitis B.^{4,7,16} This study also confirmed that HBV subgenotype A2 has become widespread among Japanese patients with acute hepatitis. However, the origin of subgenotype A2 with an LMV-resistant mutation is not clear. The possibility of it coming from a patient with chronic hepatitis B is low, because subgenotype A2 is rarely found in Japanese patients with chronic hepatitis B who receive long-term LMV treatment. The other possible infectious source is a patient co-infected with HIV. Nucleoside/nucleotide analogs (NA) such as LMV were effective for both HBV and HIV. NA were used not only for treatment of HBV but also for treatment of HIV, and LMV-resistant strains have been reported.¹⁷ HBV genotype A and HIV co-infection have been found among male

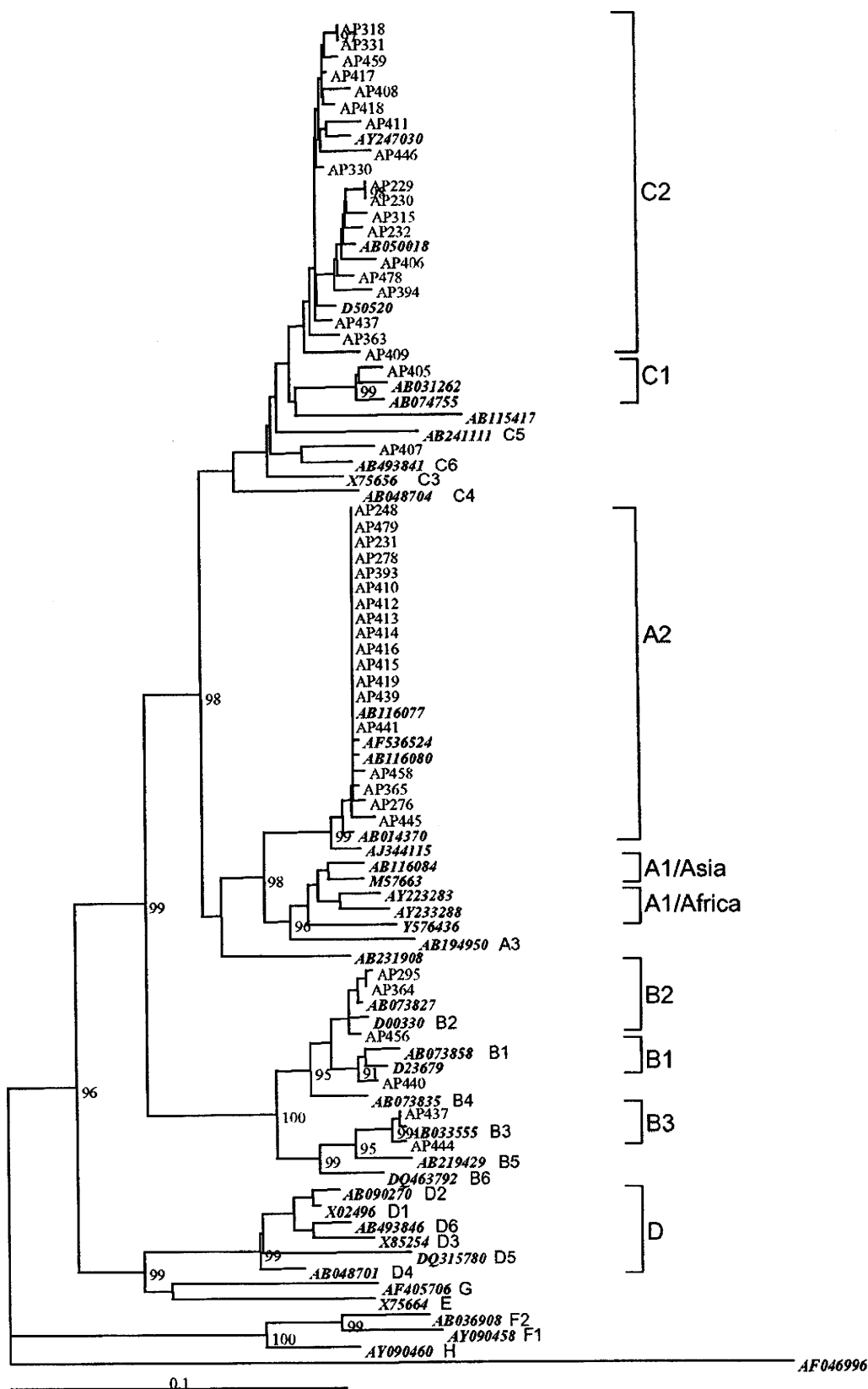


Figure 1 Results of phylogenetic analysis of 45 sequences from the preS region of hepatitis B virus (HBV) of acute hepatitis patients and 42 reference strains from a database and shown by accession number. Strains isolated from patients with acute hepatitis are indicated as AP. Phylogenetic analysis was performed by the neighbor-joining method with Woolly monkey HBV (AF046996) as out-group. Percentages of bootstrap values greater than 90% are shown on the nodes. The scale bar indicates genetic distance.

Table 1 Clinical characteristics

	Case 1	Case 2
Age (years)	32	32
Sex	Male	Male
ALT (IU/L)	4429	2820
AST (IU/L)	2709	1620
T Bil (mg/dL)	3.0	4.1
HBeAg	Positive	Positive
HBV (log copies/mL)	5.2	7.4
BCP1762/1764	T/A	A/G
PC1896	G	G
Route	STD	Unknown
Subgenotype	C2	A2

ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; HBeAg, hepatitis B e-antigen; HBV, hepatitis B virus; STD, sexually transmitted disease; T Bil, total bilirubin.

patients who have sex with men in Japan.¹⁸ Because the patient infected with subgenotype A2 that was LMV-resistant was not co-infected with HIV, this was also inconclusive. The other possibility was that the infectious source could have been a foreign patient with subgenotype A2 in whom an LMV-resistant strain emerged. This study has the following limitations: a small number of patients, patients without symptom were not recruited, the identification of the infectious source. Thus, further studies such as a nationwide survey including blood banks to investigate asymptomatic patients, the need to make conclusion of the prevalence of patients with acute hepatitis B induced by LMV-resistant strains in Japan.

The patient with LMV-resistant mutations with subgenotype C2 developed self-limited hepatitis, while the other patient with LMV-resistant mutations with subgenotype A1 developed severe acute hepatitis. Basal core promoter (BCP) and precore (PC) variants have been shown to be associated with the severity of the clinical course of acute hepatitis. In particular, mutations at BCP/PC of HBV subgenotype C2 and B1 can increase the risk of progression to fulminant hepatic failure. The clinical impacts of basal core promoter and precore variants in other genotypes are unclear.^{7,16} In the present study, both patients with acute hepatitis caused by LMV-resistant strains had wild-type BCP/PC variants. The wild-type BCP/PC variants were linked with mild self-limited hepatitis in the patient with subgenotype C2. The clinical impact of LMV-resistant strains on acute hepatitis appears to be not serious for subgenotype C2. Meanwhile, the mutations in the BCP/PC regions were not associated with the severity of acute hepatitis in the patient with subgenotype A2. Therefore, LMV-resistant mutations in subgenotype A2 might be associated with the severity of the clinical course. However, the present sample size was too small to allow evaluation of the clinical course in acute hepatitis B with LMV-resistant strains and to determine whether LMV-resistant strains have different effects on each subgenotype. Further studies are needed to clarify the influence of LMV-resistant strains on the clinical course of acute hepatitis B.

Lamivudine has begun to be used to treat patients with acute hepatitis to prevent progression to fulminant hepatic failure or chronic hepatitis. Some reports have shown the safety and effectiveness of LMV for the treatment of acute hepatitis B.^{19,20}

However, one clinical study that has been published did not confirm its efficacy.²¹ Thus, the administration of LMV in acute hepatitis B is controversial. The use of LMV for all acute hepatitis was not of benefit and was not recommended for use in all patients. However, selected patients who have a high risk for progression to fulminant hepatic failure and chronic infection may benefit from LMV to prevent disease progression. There is a small possibility that acute hepatitis B can be caused by LMV-resistant strains, but previous studies did not consider LMV-resistant strains before they started to use LMV. Caution must be exercised when determining whether LMV should be used to treat acute hepatitis B because of the possibility of the development of LMV-resistant strains. In the present study, the patient with LMV-resistant mutations who progressed to severe hepatitis was treated with LMV and steroid. Despite the limited efficacy of LMV in suppressing viral replication of LMV-resistant strains, this patient recovered from severe acute hepatitis. Patients with severe acute hepatitis have a high risk for progression to fatal liver failure. However, patients not treated with LMV may have a full recovery and not progress to fulminant liver failure, either because of the efficacy of other treatment, such as steroid, or because the patients' immune reaction could clear the HBV infection. It is difficult to judge the clinical role of LMV-resistant strains in acute hepatitis based on this case. The present study included insufficient information about the magnitude of screening for LMV-resistant strains in acute hepatitis.

Lamivudine is associated with a high incidence of resistance.²² Thus, the first-line agent for HBV infection has been changed from LMV to adefovir or entecavir because of their powerful antiviral effect and the lower likelihood of drug resistance mutations emerging. The emergence of drug resistance during long-term adefovir or entecavir therapy in chronic hepatitis B was not frequent compared to that with LMV.^{23,24} With adefovir or entecavir, the incidence of LMV-resistant strains would be remarkably decreased, but the risk for other HBV drug-resistant strains still remains. Clinical use of anti-HBV agents such as adefovir, entecavir, telbivudine, clevudine and tenofovir has started, and multiple anti-HBV drug-resistant strains could occur in patients undergoing long-term treatment in the near future. Therefore, maintaining surveillance to detect drug-resistant strains of HBV may have a small impact, but it is important for clinical practice.

In conclusion, LMV-resistant mutations were previously rare but now appear to be prevalent among patients in Japan with acute hepatitis B. LMV-resistant strains must be considered in patients with acute hepatitis B.

References

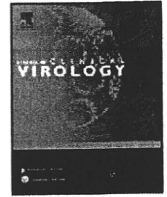
- 1 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 2002; **2**: 395–403.
- 2 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* 2004; **350**: 1118–29.
- 3 Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: A historical overview. *Vaccine* 2008; **26**: 6266–73.
- 4 Kobayashi M, Suzuki F, Arase Y *et al.* Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001. *J. Gastroenterol.* 2001; **39**: 844–50.

- 5 Yotsuyanagi H, Okuse C, Yasuda K *et al.* Distinct geographic distributions of hepatitis B virus genotypes in patients with acute infection in Japan. *J. Med. Virol.* 2005; **77**: 39–46.
- 6 Takeda Y, Katano Y, Hayashi K *et al.* Difference of HBV genotype distribution between acute hepatitis and chronic hepatitis in Japan. *Infection* 2006; **34**: 201–7.
- 7 Hayashi K, Katano Y, Takeda Y *et al.* Comparison of hepatitis B virus subgenotypes in patients with acute and chronic hepatitis B and absence of lamivudine-resistant strains in acute hepatitis B in Japan. *J. Med. Virol.* 2007; **79**: 366–73.
- 8 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987; **4**: 406–25.
- 9 Felsenstein J. phylip—Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 1989; **5**: 164–6.
- 10 Pawlotsky JM. The concept of hepatitis B virus mutant escape. *J. Clin. Virol.* 2005; **34**: S125–9.
- 11 Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C. Efficacy of long-term lamivudine monotherapy in patients with hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; **32**: 847–51.
- 12 Liaw YF, Leung NW, Chang TT *et al.* Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *Gastroenterology* 2000; **119**: 172–80.
- 13 Huy TT, Ushijima H, Quang VX *et al.* Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J. Gen. Virol.* 2004; **85**: 283–92.
- 14 Norder H, Courouce AM, Coursaget P *et al.* Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; **47**: 289–309.
- 15 Chan HL, Tsui SK, Tse CH *et al.* Epidemiological and virological characteristics of 2 subgroups of hepatitis B virus genotype C. *J. Infect. Dis.* 2005; **191**: 2022–232.
- 16 Ozasa A, Tanaka Y, Orito E *et al.* Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; **44**: 326–34.
- 17 Ramos B, Núñez M, Martín-Carbonero L *et al.* Hepatitis B virus genotypes and lamivudine resistance mutations in HIV/hepatitis B virus-coinfected patients. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2007; **44**: 557–61.
- 18 Koibuchi T, Hitani A, Nakamura T *et al.* Predominance of genotype A HBV in an HBV-HIV-1 dually positive population compared with an HIV-1-negative counterpart in Japan. *J. Med. Virol.* 2001; **64**: 435–40.
- 19 Kondili LA, Osman H, Mutimer D. The use of lamivudine for patients with acute hepatitis B (a series of cases). *J. Virul. Hepat.* 2004; **11**: 427–31.
- 20 Schmilovitz-Weiss H, Ben-Ari Z, Sikuler E *et al.* Lamivudine treatment for acute severe hepatitis B: a pilot study. *Liver Int.* 2004; **24**: 547–51.
- 21 Kumar M, Satapathy S, Monga R *et al.* A randomized controlled trial of lamivudine to treat acute hepatitis B. *Hepatology* 2007; **45**: 97–101.
- 22 Shaw T, Bartholomeusz A, Locarnini S. HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation. *J. Hepatol.* 2006; **44**: 593–606.
- 23 Yatsuji H, Suzuki F, Sezaki H *et al.* Low risk of adefovir resistance in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients treated with adefovir plus lamivudine combination therapy: two-year follow-up. *J. Hepatol.* 2008; **48**: 923–31.
- 24 Suzuki F, Toyoda J, Katano Y *et al.* Efficacy and safety of entecavir in lamivudine-refractory patients with chronic hepatitis B: randomized controlled trial in Japanese patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; **3**: 1320–6.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Transient reappearance of serum hepatitis C virus RNA observed by real-time PCR during antiviral therapy with peginterferon and ribavirin in patients with HCV genotype 1b

Hidenori Toyoda*, Takashi Kumada, Seiki Kiriya, Makoto Tanikawa, Yasuhiro Hisanaga, Akira Kanamori, Toshifumi Tada, Makiko Takagi, Takeshi Hiramatsu, Takanori Hosokawa, Takahiro Arakawa, Masashi Fujimori

Department of Gastroenterology, Ogaki Municipal Hospital, 4-86, Minaminokawa, Ogaki, Gifu 503-8502, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2009

Received in revised form

21 December 2009

Accepted 28 December 2009

Keywords:

Chronic hepatitis C
Peginterferon and ribavirin
Response-guided therapy
TaqMan PCR

ABSTRACT

Background: The “response-guided therapy” based on response of hepatitis C virus (HCV) during antiviral combination therapy with peginterferon and ribavirin is important for patients with HCV genotype 1. However, the sensitivity of previous assays for serum HCV RNA is limited.

Objectives: We evaluated the changes in serum HCV RNA during the combination therapy using a novel method for measurement based on real-time PCR.

Study design: Changes in serum HCV RNA during the combination therapy were reanalyzed using TaqMan PCR assay in 144 patients with chronic HCV genotype 1b infection who underwent the therapy under HCV RNA monitoring with the Amplicor Monitor assay. Treatment duration was elongated from 48 weeks to 72 weeks in 17 patients based on the time when serum HCV RNA became negative.

Results: In 9 of 144 (6.3%) patients, serum HCV RNA transiently appeared again on the TaqMan PCR assay after having previously become negative. At the point of reappearance, the Amplicor Monitor assay gave a negative result in all patients, and no flare of alanine aminotransferase activity was observed. Each of the 9 patients achieved an end-of-treatment response but relapsed after the end of treatment, including 3 patients in whom the treatment duration was elongated to 72 weeks.

Conclusions: Attention should be paid to this phenomenon in the antiviral treatment for patients with HCV infection. The transient reappearance of HCV RNA in the serum indicates a high likelihood of relapse, and is likely to be missed without frequent measurements by a sensitive detection method.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

The current standard antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C is combination therapy with peginterferon (PEG-IFN) and ribavirin.¹ Although the rate of sustained virologic response (SVR), which indicates the eradication of hepatitis C virus (HCV), has increased with the use of the current regimen, it is still only around 50% in patients infected with HCV genotype 1.^{2–8} The response of HCV during combination therapy, i.e., the changes in serum HCV RNA after the start of therapy have been reported to be predictors of the therapeutic outcome^{9–12}; therefore “response-guided therapy” based on this response is now favored,^{12,13} especially for patients with HCV genotype 1.

Abbreviations: HCV, hepatitis C virus; PEG-IFN, peginterferon; SVR, sustained virologic response; RVR, rapid virologic response; cEVR, complete early virologic response; ETR, end-of-treatment response.

* Corresponding author. Tel.: +81 584 81 3341; fax: +81 584 75 5715.

E-mail address: tkumada@he.mirai.ne.jp (H. Toyoda).

To improve outcome prediction and the selection of treatment duration for response-guided therapy, more precise and sensitive evaluation of serum HCV RNA is necessary. Serum HCV RNA concentration has previously been measured by the branched-DNA probe assay and, more recently, by the Amplicor Monitor assay.^{14,15} However, the sensitivity of these assays is limited. Very recently, a novel method for measurement of serum HCV RNA, based on real-time PCR, has been established, and is reported to have high sensitivity for the detection of serum HCV RNA.^{16–18}

2. Objectives

In the present study, we used the real-time PCR-based TaqMan assay to reanalyze the changes in serum HCV RNA from stored serum samples of patients with chronic HCV genotype 1 infection. These patients had undergone antiviral combination therapy with PEG-IFN and ribavirin under monitoring of serum HCV RNA using the Amplicor Monitor assay. In some patients, we observed a reappearance of serum HCV RNA during the treatment after hav-